

16060/PCT

**BESCHREIBUNG**Probenablageeinrichtung für einen Zellsortierer

5 Die Erfindung betrifft eine Probenablageeinrichtung, insbesondere für einen Zellsortierer, gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1, sowie ein entsprechendes Probenablageverfahren gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 37.

10 Aus US 5 489 506 ist ein Zellsortierer bekannt, der es ermöglicht, biologische Zellen in einem Trägerstrom dielektrophoretisch zu trennen, wobei die zur Trennung verwendeten dielektrophoretischen Effekte beispielsweise in MÜLLER, T. et al.: "A 3-D microelectrode system for handling and caging  
15 single cells and particles", Biosensors & Bioelectronics 14 (1999) 247-256 beschrieben sind. Die zu sortierenden biologischen Zellen werden hierbei entsprechend einem vorgegebenen Sortierkriterium in eine von mehreren Ausgangsleitungen sortiert, wobei die Ausgangsleitungen jeweils in einzelne Pro-  
20 benbehälter münden.

Nachteilig an dieser bekannten Probenablageeinrichtung ist die Tatsache, dass der Zellsortierer eine Vielzahl von Ausgangsleitungen benötigt, um die einzelnen Proben den ver-  
25 schiedenen Probenbehältern zuführen zu können. Hierfür werden bei der bekannten Probenablageeinrichtung an den Ausgangsleitungen jeweils individuelle Saugpumpen benötigt.

Weiterhin ist ein Zellsortierer bekannt, der lediglich eine  
30 einzige Ausgangsleitung aufweist, wobei in dem Zellsortierer biologische Zellen entsprechend einem vorgegebenen Selektionskriterium ausselektiert werden können, so dass die ausselektierten biologischen Zellen nicht in die Ausgangsleitung gelangen. Die Ausgangsleitung des Zellsortierers ist hierbei

über einer als Probenablage dienenden Mikrotiterplatte beweglich, so dass die von dem Zellsortierer ausgegebenen Proben durch eine geeignete Positionierung der Mündungsöffnung der Ausgangsleitung des Zellsortierers in den gewünschten Probenbehälter verbracht werden können.

Hierbei werden die Zellen an der Ausgangsleitung in Flüssigkeitstropfen vereinzelt, die in die Probenbehälter der Probenablage gelenkt werden. Die damit verbundene Aerosolbildung erschwert eine fehlerfreie Ablage der Proben und ist anfällig für Verunreinigungen in die Proben hinein und aus der Probe heraus.

Nachteilig an dieser bekannten Probenablageeinrichtung mit einer einstellbaren Positionierung der Ausgangsleitung des Zellsortierers ist weiterhin die Tatsache, dass der Sortierprozess in dem Zellsortierer durch die Bewegung der Ausgangsleitung gestört wird.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, die vorstehend beschriebene bekannte Probenablageeinrichtung für einen Zellsortierer dahingehend zu verbessern, dass der Sortiervorgang in dem Zellsortierer durch die Probenablage nicht gestört wird und nur gewünschte Zellen aus der Ausgangsleitung des Zellsortierers in die Probenablage gelangen.

Diese Aufgabe wird, ausgehend von der vorstehend beschriebenen bekannten Probenablageeinrichtung gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1, durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1 gelöst.

Hinsichtlich eines entsprechenden Verfahrens wird die Aufgabe durch ein Probenablageverfahren gemäß Anspruch 35 gelöst.

Die Erfindung geht von der technischen Erkenntnis aus, dass die Bewegung der Ausgangsleitung des Zellsortierers bei der Positionierung über der Mikrotiterplatte der Probenablageeinrichtung mit einer strömungstechnischen Rückkopplung in den Zellsortierer verbunden ist, wodurch die Sortiervorgänge in dem Zellsortierer gestört werden.

Die Erfindung umfasst deshalb die allgemeine technische Lehre, die Ausgangsleitung des Zellsortierers und damit die Probenzuführung der Probenablageeinrichtung ortsfest anzuordnen, um die vorstehend erwähnten störenden strömungstechnischen Rückkopplungen in den Zellsortierer zu vermeiden.

Die Zuordnung und individuelle Ablage der einzelnen Proben in den verschiedenen Probenbehältern der Probenablage erfolgt dagegen im Rahmen der Erfindung durch eine geeignete Positionierung der Probenablage.

Der im Rahmen der Erfindung verwendete Begriff einer Probenzuführung ist allgemein zu verstehen und nicht auf einen Schlauch oder eine Leitung beschränkt, wie es bei dem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung der Fall ist.

Darüber hinaus ist auch der im Rahmen der Erfindung verwendete Begriff einer Probenablage allgemein zu verstehen und nicht auf die im bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung verwendete Mikrotiterplatte beschränkt. Stattdessen können als Probenablage auch andere Aufnahmegefäße oder Anordnungen von Aufnahmegefäßen verwendet werden.

30

Vorzugsweise weist die Probenzuführung der erfindungsgemäßen Probenablageeinrichtung jedoch eine Leitung oder einen Schlauch auf, dessen Mündungsöffnung ortsfest über der Probenablage fixiert ist. Die aus dem Schlauch bzw. der Leitung

austretenden Proben fließen dabei aufgrund der Schwerkraft und einer gegebenen Pumprate nach unten in Richtung der Probenablage in einen der Probenbehälter, wobei die Auswahl des gewünschten Probenbehälters durch eine geeignete Positionierung der Probenablage erfolgt.

Besonders vorteilhaft ist es hierbei, wenn der Schlauch durch ein Führungsteil geführt wird, um die Mündungsöffnung des Schlauchs in Richtung auf die Probenablage auszurichten. Dies ist sinnvoll, da der Schlauch ansonsten aufgrund seiner Eigenelastizität eine unerwünschte räumliche Ausrichtung annehmen könnte, so dass die aus dem Schlauch austretende Probe möglicherweise nicht in die Probenablage gelangen würde. Diese Führung des Schlauchs durch das Führungsteil ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn sich die Probenablage in einem Raum (z.B. einem Inkubator) befindet, der möglichst steril zu halten ist, da der Schlauch dann in den sterilen Raum eingebracht werden kann, ohne dass in den sterilen Raum hineingegriffen werden muss, was mit einer unerwünschten Einbringung von Keimen verbunden wäre.

Die Führung des Schlauchs kann beispielsweise durch eine in dem Führungsteil angebrachte Nut erfolgen, in die der Schlauch einführbar ist, um den Schlauchverlauf festzulegen und die Mündungsöffnung des Schlauchs auf die Probenablage auszurichten.

Vorzugsweise weist die Nut hierbei an den Nuträndern Vorsprünge auf, die den Schlauch im eingeführten Zustand festklemmen und dadurch ein Herausrutschen des Schlauchs während des Betriebs der Probenablageeinrichtung verhindern.

Es ist jedoch alternativ auch möglich, dass der Schlauch mit der zugehörigen Nut eine Presspassung bildet, so dass der Schlauch in der Nut kraftschlüssig fixiert wird.

- 5 Vorzugsweise ist das Führungsteil für den Schlauch autoklavierbar, um eine mehrfache Sterilisation zu ermöglichen. Als Material zur Herstellung des Führungsteils eignet sich deshalb vorteilhaft PEEK, jedoch kann das Führungsteil grundsätzlich auch aus anderen Materialien bestehen.

10

In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung ist der Schlauch bzw. das Führungsteil mit dem Schlauch lösbar über der Probenablage fixiert. Diese lösbare Montage des Führungsteils bzw. des Schlauchs oberhalb der Probenablage ermöglicht  
15 vorteilhaft eine einfache Montage sowie einen schnellen Schlauchwechsel, da der Schlauch außerhalb der Probenablageeinrichtung in das Führungsteil eingeführt werden kann.

Die lösbare Montage des Schlauchs bzw. des Führungsteils mit  
20 dem Schlauch kann beispielsweise mittels eines Haltemagneten erfolgen, der den Schlauch bzw. das Führungsteil mit dem Schlauch lösbar über der Probenablage fixiert. Eine Möglichkeit hierzu besteht darin, dass der Haltemagnet an dem Führungsteil angebracht ist, während an der Probenablageeinrichtung  
25 ortsfest ein zugehöriges magnetisierbares Halteelement oder ein weiterer Haltemagnet angeordnet ist. Vorzugsweise ist jedoch an dem Führungsteil ein magnetisierbares Halteelement angebracht, während der zugehörige Haltemagnet ortsfest an der Probenablageeinrichtung montiert ist.

30

Vorzugsweise ist das magnetisierbare Halteelement hierbei in das Führungsteil eingegossen oder von dem Führungsteil umspritzt, um eine Korrosion des magnetisierbaren Halteelements zu verhindern. Dies ist sinnvoll, da magnetisierbare Stähle

zumeist eine unbefriedigende Korrosionsbeständigkeit aufweisen. Die korrosionsgeschützte Anordnung des magnetisierbaren Halteelements in dem Führungsteil erweitert deshalb den konstruktiven Gestaltungsspielraum bei der Auswahl des Werkstoffs für das magnetisierbare Halteelement.

Es wurde bereits vorstehend ausgeführt, dass die Zuordnung der abzulegenden Proben zu den einzelnen Probenbehältern der Probenablage durch eine geeignete Positionierung der Probenablage erfolgt. Vorzugsweise ist deshalb ein Stellglied vorgesehen, um die Probenablage entsprechend zu positionieren. Ein derartiges Stellglied kann beispielsweise ein Elektromotor oder ein pneumatisches Stellglied sein, jedoch ist die Erfindung hinsichtlich des technischen Prinzips des Stellglieds zur Positionierung der Probenablage nicht auf die vorstehend beschriebenen Typen von Stellgliedern beschränkt.

Vorzugsweise ermöglicht das Stellglied jedoch eine Positionierung der Probenablage in mindestens zwei Raumrichtungen, die vorzugsweise in einer waagerechten Ebene liegen.

Darüber hinaus ist es vorteilhaft, wenn die Probenablage auch in Richtung auf die Probenzuführung bzw. die Mündungsöffnung des Zuführungsschlauchs bewegt werden kann. Die Probenablage wird dann bei der Ablage der Proben vorzugsweise so weit in Richtung auf die Probenzuführung bewegt, dass die Probenzuführung in die in der Probenablage befindliche Flüssigkeit eintaucht. Bei einem Schlauch als Probenzuführung wird die Probenablage also vorzugsweise so weit nach oben bewegt, bis die Mündungsöffnung des Schlauchs in die in dem Probenbehälter befindliche Flüssigkeit eintaucht. Dieses Eintauchen der Probenzuführung bei der Ablage der Proben ist vorteilhaft, da auf diese Weise eine Tropfenbildung mit einer nachfolgenden Tropfenablösung verhindert wird, wodurch die Kontaminations-

sicherheit der Probenablageeinrichtung erhöht und eventuelle Fehler minimiert werden. Darüber hinaus ist ein Tropfenabriss an der Probenzuführung auch deshalb störend, weil beim Abtropfen strömungsdynamische Rückkopplungen auftreten, die über die Probenzuführung in den Zellsortierer zurückwirken und dort die Sortiervorgänge stören. Die Probenablage ist also vorzugsweise in drei Raumrichtungen positionierbar, wobei die Positionierung in waagerechter Richtung der Auswahl eines Probenbehälters dient, während die Positionierung in senkrechter Richtung die Probenzuführung in die Probenablage eintauchen soll, um eine störende Tropfenbildung und -ablösung zu verhindern.

Der störende Tropfenabriss an der Probenzuführung kann jedoch auch dadurch verhindert werden, dass der Abstand zwischen der Probenzuführung und der darunter befindlichen Probenablage kleiner als eine materialabhängige Tropfenabrissgröße ist. In dieser Variante der Erfindung kann sich zwar an der Probenzuführung zunächst ein Tropfen bilden, was jedoch unschädlich ist, solange sich der Tropfen nicht von der Probenzuführung ablöst. Ab einer bestimmten Größe des Tropfens berührt dieser jedoch die Probenablage oder taucht in die Probenablage ein, was zu einer kontrollierten Abgabe des Tropfens ohne die störenden strömungsdynamischen Effekte führt. Die Tropfenabrissgröße hängt hierbei von dem Probenmaterial und insbesondere von der Dichte und der Kohäsionskraft des Probenmaterials ab, so dass der Abstand zwischen der Probenzuführung und der Probenablage entsprechend eingestellt werden sollte.

Weiterhin ist es vorteilhaft, wenn die gesamte Probenablage in einem Inkubator angeordnet ist, der vorzugsweise eine Klimatisierungseinrichtung aufweist, um die Temperatur und/oder die Luftfeuchtigkeit in dem Inkubator einzustellen. Dies ist

bei der Ablage von biologischen Proben vorteilhaft, die ein bestimmtes klimatisches Milieu benötigen.

Vorzugsweise wird der Inkubator mit vorgefilterter, steriler  
5 Luft mit leichtem Überdruck betrieben. Der Überdruck verhindert hierbei wie bei einer Reinraumbelüftung ein Eindringen von Keimen von außen.

Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit einer CO<sub>2</sub>-  
10 Begasung des Inkubators und einer Einstellung der Luftfeuchtigkeit, um Flüssigkeitsverdunstungen aus den Probenbehälter heraus zu vermeiden.

Zur Überwachung der Probenablage kann in dem Inkubator ein  
15 Sichtfenster angeordnet sein, wobei das Sichtfenster beispielsweise in Form einer Klappe geöffnet werden kann, um nötigenfalls einen manuellen Zugriff zu erlauben.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass in dem Inkubator  
20 eine Kamera angeordnet ist, um den Vorgang der Probenablage zu überwachen. In diesem Fall kann auf ein Sichtfenster in dem Inkubator verzichtet werden.

Die Probenablage (z.B. eine Mikrotiterplatte) ist vorzugswei-  
25 se lösbar in der erfindungsgemäßen Probenablageeinrichtung angeordnet, um eine Auswechslung der Probenablage zu ermöglichen. Beispielsweise kann die Probenablage manuell oder von einem Roboter in die Probenablageeinrichtung eingeführt werden. Bei einer Mikrotiterplatte als Probenablage sollte der  
30 Deckel der Mikrotiterplatte erst nach dem Einführen in die Probenablageeinrichtung bzw. den Inkubator geöffnet werden, um eine Kontamination zu vermeiden. Weiterhin ist es bei einer Mikrotiterplatte als Probenablage vorteilhaft, wenn diese durch seitlich angebrachte Metallkugeln oder federnde Kugel-



druckstücke geführt wird. Die Metallkugeln bzw. die federnden Kugeldruckstücke gewährleisten auch einen Ausgleich von Maßtoleranzen der verwendeten Mikrotiterplatten. So weichen die Abmessungen der verwendeten Mikrotiterplatten aufgrund von Fertigungstoleranzen u.U. geringfügig voneinander ab, was auf diese Weise ausgeglichen wird.

Darüber hinaus kann die Probenablage (z.B. eine Mikrotiterplatte) mit einer Folie abgedeckt sein, die von der Probenzuführung (z.B. einer Schlauchspitze) penetrierbar ist, um die Proben in der Probenablage abzulegen. Eine derartige Folienabdeckung der Probenablage ermöglicht ein steriles Ablegen der Proben, verringert die Verdunstung und reduziert die pH-Verschiebung. Bei der Folie zur Abdeckung der Probenablage kann es sich beispielsweise um eine Aluminium-, Silikon- oder Gummifolie handeln.

Ferner ist zu erwähnen, dass der im Rahmen der Erfindung verwendete Begriff einer Probe allgemein zu verstehen ist und nicht auf biologische Zellen beschränkt ist, die von einem Zellsortierer sortiert werden.

Vorteilhaft an der erfindungsgemäßen Probenablageeinrichtung ist die Möglichkeit eines kontaminationsarmen Arbeitens. Die Bauform und Ausführung der Probenablageeinrichtung ist raumoptimiert für die Verminderung sowohl des Eintrags von Verunreinigungen (z.B. Keime) in die Probe, als auch für die Verminderung der Übertragung von Stoffen (z.B. Krankheitserregern) über die Luft aus der Probe. Weiterhin ist die erfindungsgemäße Probenablageeinrichtung optimiert auf eine schnelle, schonende und fehlerfreie Ablage von Partikeln (z.B. biologische Zellen) in die Probenablage oder ein sonstiges Aufnahmegefäß.

Schließlich umfasst die Erfindung auch einen Zellsortierer, einen Partikelmanipulator und ein Fluidiksystem mit einer erfindungsgemäßen Probenablageeinrichtung, wie sie vorstehend beschrieben wurde.

5

Andere vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind in dem Unteransprüchen gekennzeichnet oder werden nachstehend zusammen mit der Beschreibung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Figuren näher erläutert. Es zeigen:

10

Figur 1 ein Fluidikschaubild eines erfindungsgemäßen Zellsortierers ohne die erfindungsgemäße Probenablageeinrichtung,

15

Figur 2 eine perspektivische Darstellung des Zellsortierers aus Figur 1 mit der erfindungsgemäßen Probenablageeinrichtung,

20

Figur 3 eine Frontansicht des Zellsortierers aus Figur 2 im Bereich der Probenablageeinrichtung sowie

Figur 4 eine Perspektivansicht der Mechanik der Probenablageeinrichtung aus Figur 3.

25

Die schematische Darstellung in Figur 1 zeigt einen erfindungsgemäßen Zellsortierer, der mittels eines mikrofluidischen Sortierchips 1 biologische Zellen dielektrophoretisch sortiert, wobei der Sortierchip 1 schwingungsgedämpft gelagert ist.

30

Die Techniken der dielektrophoretischen Beeinflussung von biologischen Zellen sind beispielsweise in MÜLLER, T. et al.: "A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles", Biosensors & Bioelectronics 14 (1999)

247-256 beschrieben, so dass im folgenden auf eine detaillierte Beschreibung der dielektrophoretischen Prozesse in dem Sortierchip 1 verzichtet wird und diesbezüglich auf die vorstehende Veröffentlichung verwiesen wird.

5

Der Sortierchip 1 weist zur fluidischen Kontaktierung mehrere Anschlüsse 2-6 auf, wobei die fluidische Kontaktierung der Anschlüsse 2-6 in DE 102 13 272 beschrieben ist, deren Inhalt der vorliegenden Beschreibung zuzurechnen ist.

10

Der Anschluss 2 des Sortierchips 1 dient zur Aufnahme eines Trägerstroms mit den zu sortierenden biologischen Zellen, während der Anschluss 3 des Sortierchips 1 zur Abführung der ausselektierten biologischen Zellen dient, die auf dem Sortierchip 1 nicht weiter untersucht werden. Die ausselektierten biologischen Zellen können von einer Saugspritze 7 aufgefangen werden, die an den Anschluss 3 des Sortierchips 1 angeschlossen werden kann. Der Ausgang 5 des Sortierchips 1 dient dagegen zur Abführung der interessierenden biologischen Zellen, die anschließend weiter verarbeitet oder untersucht werden können.

15

20

Ferner dienen die Anschlüsse 4 und 6 des Sortierchips 1 zur Zuführung eines sogenannten Hüllstroms, der die Aufgabe hat, die selektierten biologischen Zellen zu dem Anschluss 5 des Sortierchips 1 zu führen. Hinsichtlich der Funktionsweise des Hüllstroms wird auf die deutsche Patentanmeldung DE 100 05 735 verwiesen, so dass im folgenden auf eine detaillierte Beschreibung der Funktionsweise des Hüllstroms verzichtet werden kann.

25

30

Die Anschlüsse 4 und 6 des Sortierchips sind über zwei Hüllstromleitungen 8, 9, ein Y-Stück 10 und ein Vier-Wege-Ventil

11 mit einem Druckbehälter 12 verbunden, in dem sich ein Kultivierungsmedium für den Hüllstrom befindet.

Der Druckbehälter 12 wird über eine Druckluftleitung 13 unter  
5 Überdruck gesetzt, so dass das in dem Druckbehälter 12 befindliche Kultivierungsmedium bei einer entsprechenden Stellung des Vier-Wege-Ventils 11 über das Y-Stück 10 und die Hüllstromleitungen 8, 9 zu den Anschlüssen 4, 6 des Sortierchips 1 strömt.

10

Der Anschluss 2 des Sortierchips 1 ist dagegen über eine Trägerstromleitung 14 mit einem Partikelinjektor 15 verbunden.

15

Stromaufwärts ist der Partikelinjektor 15 über ein T-Stück 16 mit einer Trägerstromspritze 17 verbunden, die maschinell angetrieben wird und einen vorgegebenen Flüssigkeitsstrom eines Trägerstroms injiziert.

20

Darüber hinaus ist das T-Stück 16 stromaufwärts über ein weiteres Vier-Wege-Ventil 18 und eine Füllstromleitung 19 mit einem Drei-Wege-Ventil 20 verbunden. Das Drei-Wege-Ventil 20 ermöglicht eine Spülung der Hüllstromleitungen 8, 9 sowie der Trägerstromleitung 14 vor dem eigentlichen Betrieb.

25

Hierzu ist das Drei-Wege-Ventil 20 stromaufwärts über eine Peristaltikpumpe 21 mit drei Drei-Wege-Ventilen 22.1-22.3 verbunden, an die jeweils ein Spritzenreservoir 23.1-23.3 angeschlossen ist. Die Spritzenreservoirs 23.1-23.3 dienen hierbei zur Zuführung eines Füllstroms zum Spülen des gesamten Fluidiksystems vor dem eigentlichen Betrieb, wobei das  
30 Spritzenreservoir 23.1 70% Ethanol enthält, während das Spritzenreservoir 23.2 als Füllstromsubstanz Aqua destillata enthält. Das Spritzenreservoir 23.3 enthält schließlich eine Manipulationsflüssigkeit, wie beispielsweise eine Pufferlösung als Füllstromsubstanz.

Ferner weist der Zellsortierer einen Auffangbehälter 27 für überschüssigen Hüllstrom sowie einen Auffangbehälter 28 für überschüssigen Füllstrom auf.

5

Im folgenden wird zunächst der Spülvorgang beschrieben, der vor dem eigentlichen Betrieb des Zellsortierers durchgeführt wird, um die Hüllstromleitung 8, 9, die Trägerstromleitung 14 und das restliche Fluidiksystem des Zellsortierers von Luft-  
10 blasen und Verunreinigungen zu befreien.

Hierzu wird zunächst das Drei-Wege-Ventil 22.1 geöffnet und Ethanol von dem Spritzenreservoir 23.1 als Füllstrom eingespritzt, wobei das Ethanol von der Peristaltikpumpe 21 zunächst zu dem Drei-Wege-Ventil 20 gefördert wird. Während des  
15 Spülvorgangs ist das Drei-Wege-Ventil 20 so eingestellt, dass ein Teil des von der Peristaltikpumpe 21 geförderten Füllstroms über die Füllstromleitung 19 weiter geleitet wird, während der restliche Teil des von der Peristaltikpumpe 21  
20 geförderten Füllstroms zu dem Vier-Wege-Ventil 11 gelangt. Die beiden Vier-Wege-Ventile 11, 18 sind wiederum so eingestellt, dass der Füllstrom durch die Hüllstromleitungen 8, 9 und die Trägerstromleitung 14 durchgeleitet wird. Weiterhin fließt Kultivierungsmedium aus dem Druckbehälter 12 in den  
25 Auffangbehälter 27, um die Leitungen kurz zu fluten.

Nach der vorstehend beschriebenen Spülung des Zellsortierers mit Ethanol erfolgt in der gleichen Weise eine Spülung mit Aqua destillata bzw. einer Manipulationsflüssigkeit, wie beispielsweise einer Pufferlösung, wobei jeweils die Drei-Wege-  
30 Ventile bzw. 22.2 bzw. 22.3 geöffnet werden.

Bei dem vorstehend beschriebenen Spülvorgang kann überschüssiger Füllstrom von dem Vier-Wege-Ventil 18 in den Auffangbehälter 28 abgeleitet werden.

- 5 Nach dem Spülvorgang werden die Drei-Wege-Ventile 22.1-22.3 geschlossen und die Peristaltikpumpe 21 abgeschaltet.

Zur Einleitung des Sortierbetriebs wird das Vier-Wege-Ventil 11 so eingestellt, dass der Druckbehälter 12 mit dem Y-Stück 10 verbunden wird, so dass die in dem Druckbehälter 12 befindliche Manipulationsflüssigkeit (z.B. ein Kultivierungsmedium) aufgrund des in dem Druckbehälter 12 herrschenden Überdrucks in die Hüllstromleitungen 8, 9 gedrückt wird.

- 15 Weiterhin wird während des Sortierbetriebs das Vier-Wege-Ventil 18 so eingestellt, dass keine Strömungsverbindung zwischen dem T-Stück 16 und dem Vier-Wege-Ventil 18 besteht.

Der von der Trägerstromspritze 17 eingespritzte Trägerstrom fließt dann über das T-Stück 16 in den Partikelinjektor 15, wobei durch eine weitere Injektionsspritze 29 biologische Zellen in den Trägerstrom eingespritzt werden. Anschließend fließt der Trägerstrom mit den injizierten biologischen Zellen von dem Partikelinjektor 15 über die Trägerstromleitung 14 zu dem Anschluss 2 des Sortierchips.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass an dem Partikelinjektor 15 ein Temperatursensor 30 angebracht ist, um die Temperatur T des Partikelinjektors 15 zu messen.

30

Darüber hinaus befindet sich an dem Partikelinjektor 15 ein Temperierelement 31 in Form eines Peltier-Elements, um den Partikelinjektor 15 beheizen oder abkühlen zu können.

Die Heiz- bzw. Kühlenergie  $Q$  wird hierbei von einem Temperaturregler 32 vorgegeben, der eingangsseitig mit dem Temperatursensor 30 verbunden ist und die Temperatur  $T$  des Partikelinjektors 15 auf einen vorgegebenen Sollwert einregelt.

5

Im folgenden wird nun die in Figur 2 dargestellte Perspektivansicht des in Figur 1 gezeigten Zellsortierers beschrieben.

Der Zellsortierer ist in einem aus Kunststoff bestehenden Gehäuse 33 untergebracht, wobei das Gehäuse 33 eine durchsichtige Abdeckung aufweist, um eine Sichtkontrolle des Betriebs des Zellsortierers zu ermöglichen.

In dem Gehäuse 33 befindet sich ein Aufbau mit einer sogenannten Docking-Station 34, in die die wesentlichen Fluidik-Bestandteile sowie die elektrischen Zuleitungen des Zellsortierers auf einer Hauptplatte eingeschoben werden können. Die Docking-Station 34 des Zellsortierers ermöglicht also vorteilhaft ein schnelles und einfaches Auswechseln der wesentlichen Komponenten des Zellsortierers.

Der Aufbau des Zellsortierers trägt weiterhin den Sortierchip 1, wobei oberhalb des Sortierchips 1 eine Durchlichteinrichtung 35 angeordnet ist, um den durch den Sortierchip 1 fließenden Trägerstrom mit den darin suspendierten Partikeln zu beleuchten.

In der Zeichnung rechts neben dem Sortierchip 1 ist eine Probenablageeinrichtung angeordnet, die als Probenablage eine Mikrotiterplatte 36 aufweist.

Die Probenablageeinrichtung mit der Mikrotiterplatte 36 ist hierbei in einem Inkubator 37 angeordnet, wobei der Inkubator 37 eine Klimatisierungseinrichtung aufweist, um die Tem-

peratur, die Luftfeuchtigkeit und/oder die CO<sub>2</sub>-Begasung in dem Inkubator 37 zu regeln. Die Klimatisierung in dem Inkubator 37 ist wichtig, damit die in der Mikrotiterplatte 36 abgelegten biologischen Proben auch bei einer vorübergehenden  
5 Zwischenlagerung in der Mikrotiterplatte 36 unbeschädigt steril bleiben. Darüber hinaus erzeugt die Klimatisierungseinrichtung einen leichten Überdruck in dem Inkubator 37, damit keine Partikel von außen in den Inkubator 37 eindringen, da dies zu einer Kontamination führen könnte. Ferner filtert die  
10 Klimatisierungseinrichtung die Luft, die in den Inkubator 37 eindringt und verhindert dadurch ebenfalls eine Kontamination der Proben.

An seiner Frontseite weist der Inkubator 37 eine Klappe aus  
15 durchsichtigem Kunststoff auf, die ein Sichtfenster bildet, was eine Sichtkontrolle der Probenablageeinrichtung ermöglicht.

Darüber hinaus ist in dem Inkubator 37 eine kleine Kamera angebracht, um die Ablage der Proben und insbesondere das Ein-  
20 tauchen eines Schlauchs 38 in die Probenbehälter der Mikrotiterplatte 36 überwachen zu können, wobei die Kamera zur Vereinfachung nicht dargestellt ist. Vorzugsweise kann eine zusätzliche LED-Beleuchtung vorgesehen sein.

25

Der Schlauch 38 besteht hierbei aus Teflon, jedoch kann der Schlauch 38 alternativ auch aus PE-Kapillaren, anderen Kunststoffen oder Glas bestehen.

30 Im folgenden wird nun unter Bezugnahme auf die Figuren 3 und 4 der Aufbau der erfindungsgemäßen Probenablageeinrichtung beschrieben.



An den Anschluss 5 des Sortierchips 1 ist der Schlauch 38 angeschlossen, wobei die fluidische Kontaktierung des Sortierchips 1 durch den Schlauch 38 in DE 102 13 272 beschrieben ist, deren Inhalt der vorliegenden Beschreibung zuzurechnen ist, so dass im vorliegenden auf eine detaillierte Beschreibung der fluidischen Kontaktierung des Sortierchips 1 durch den Schlauch 38 verzichtet werden kann.

Der Schlauch 38 ist durch eine seitliche, abgedichtete Öffnung in dem Inkubator 37 in das Innere des Inkubators 37 hineingeführt, wobei die Mündungsöffnung des Schlauchs 38 oberhalb der Mikrotiterplatte 36 angeordnet und in Richtung auf die Mikrotiterplatte 36 ausgerichtet ist. Durch die Abdichtung der seitlichen Öffnung und den leichten Überdruck in dem Inkubator 37 bleibt die Sterilität hierbei erhalten. Die Ausrichtung des Schlauchs 38 wird durch ein Führungsteil 39 erreicht, das seitlich eine Nut aufweist, in die der Schlauch 38 eingepresst ist, so dass der Nutverlauf die Ausrichtung des Schlauchs 38 oberhalb der Mikrotiterplatte 36 bestimmt. An den Nutflanken der Nut in dem Führungsteil 39 sind hierbei einstückig Vorsprünge angeformt, die ein Herausrutschen des Schlauchs 38 aus der Nut des Führungsteils 39 verhindern.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass das Ende des Schlauchs 38 in dem Führungsteil 39 innerhalb der Probenablageeinrichtung ortsfest angebracht ist. Dies bietet den Vorteil, dass keine störenden strömungstechnischen Rückkopplungen über den Schlauch 38 in den Sortierchip 1 auftreten, so dass die Sortiervorgänge in dem Sortierchip 1 ungestört ablaufen können.

Die ortsfeste Anbringung des Führungsteils 39 in dem Schlauch 38 erfolgt durch einen Haltemagneten 40, der an der Innenwand des Inkubators 37 befestigt ist.

Der Haltemagnet 40 wirkt mit einem Halteelement zusammen, das aus einem magnetisierbaren Material besteht und in das Führungsteil 39 eingearbeitet ist.

- 5 Die Befestigung des Führungsteils 39 mit dem Schlauch 38 an dem Haltemagneten 40 ermöglicht vorteilhaft eine einfache, keimarme Montage.

10 In dem dargestellten Ausführungsbeispiel besteht das Führungsteil 39 aus PEEK und ist damit autoklavierbar, so dass eine Sterilisation des Führungsteils 39 möglich ist.

Über den Schlauch 38 können die von dem Zellsortierer abgegebenen Proben in die verschiedenen Probenbehälter der Mikrotiterplatte 36 eingebracht werden. Die Auswahl des gewünschten Probenbehälters der Mikrotiterplatte 36 erfolgt hierbei durch eine geeignete Positionierung der Mikrotiterplatte 36 relativ zu der Mündungsöffnung des Schlauchs 38, wozu die in Figur 4 dargestellte Mechanik dient.

20

Darüber hinaus können nicht gewünschte Zellen oder Spülflüssigkeit in einen Auffangbehälter befördert werden, der sich direkt neben der Mikrotiterplatte 36 befindet.

- 25 So ist die Mikrotiterplatte 36 in eine Aufnahme 41 eingelegt, wobei die Aufnahme 41 durch drei Elektromotoren 42-44 in x-, y- und z-Richtung positionierbar ist.

30 Darüber hinaus kann die Aufnahme 41 durch Lösen einer Knaufschraube 45 aus der Probenablageeinrichtung entnommen werden. Es besteht jedoch alternativ auch die Möglichkeit, dass die Aufnahme 41 durch eine Rastung gehalten wird. Die Entnahme der Aufnahme 41 aus der Probenablageeinrichtung erfolgt dann, indem die Aufnahme über den Rastpunkt herausgezogen wird.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass die Aufnahme 41 neben der Mikrotiterplatte 36 einen entnehmbaren Auffangbehälter 46 ("Waste Container") aufweist, in den Proben verbracht werden können, die nicht weiter interessieren und deshalb nicht in der Mikrotiterplatte 36 abgelegt werden sollen.

Der Auffangbehälter 46 besteht aus einem autoklavierbaren Material und weist an seiner Oberseite einen abnehmbaren Deckel auf.

Darüber hinaus befinden sich an der Oberseite des Auffangbehälters 46 muldenförmige Ausformungen 47, 48, um bei der Ablage von Proben in den Auffangbehälter 46 einen störenden Tropfenabriss zu verhindern, wie nachfolgend beschrieben wird.

Hierzu wird die Aufnahme 41 so positioniert, dass sich die Mündungsöffnung des Schlauchs 38 über einer der beiden Ausformungen 47, 48 befindet.

Anschließend wird die Aufnahme 41 nach oben in Richtung auf die Mündungsöffnung des Schlauchs 38 gefahren, bis der Schlauch 38 auf die Ausformung 48 bzw. 47 tupft, wobei sich die in dem Schlauch 38 befindliche Probe ablöst und in den Auffangbehälter 46 gelangt. Hierbei erfolgt jedoch kein Tropfenabriss, so dass auch keine störenden strömungsdynamischen Effekte auftreten. Die Aufnahme wird hierbei nur so weit nach oben gefahren, dass der Tropfen an der Mündungsöffnung des Schlauchs 38 abfließen kann, wobei jedoch kein Berührungskontakt zwischen dem Schlauch 38 und der Aufnahme 41 stattfindet.

In dem Auffangbehälter 46 kann sich an der Oberseite eine Sackbohrung mit einem Volumen von ungefähr 50  $\mu$ l befinden, die jedoch zur Vereinfachung nicht dargestellt ist. Diese Sackbohrung ermöglicht eine Überprüfung der Hüllstromrate (Hüllstromvolumen pro Zeit) vor jedem Sortierprozess. Hierzu wird die Sackbohrung mit dem austretenden Hüllstrom gefüllt, wobei die Zeitdauer bis zur Füllung der Sackbohrung gemessen wird, woraus sich dann die Hüllstromrate ergibt.

- 10 Darüber hinaus weist der Schlauch 38 eine angeschrägte Spitze und eine hydrophile Beschichtung auf, um den störenden Tropfenabriss bei der Probenablage zu verhindern.

15 Ferner ermöglicht die Spitze des Schlauchs 38 das Durchstechen einer Folie, welche die Mikrotiterplatte 36 abdeckt. Diese Folie kann beispielsweise aus Aluminium oder Silikon bestehen und ermöglicht eine sterile Probenablage. Darüber hinaus verhindert die Folie auch eine Verdunstung aus der Mikrotiterplatte 36 und reduziert die pH-Verschiebung.

20

Die Spitze kann hierbei auch als separates Bauteil hergestellt und auf die Mündungsöffnung des Schlauchs 38 aufgesteckt werden.

- 25 Zur weiteren Verringerung der Tropfenabrissgröße kann dem Trägerstrom auch ein Netzmittel beigemischt werden, das die Oberflächenspannung der Trägerflüssigkeit verringert und dadurch der störenden Tropfenbildung entgegen wirkt.

- 30 Darüber hinaus besteht zur Vermeidung eines störenden Tropfenabrisses auch die Möglichkeit, dass die Mikrotiterplatte 36 so positioniert wird, dass ein an der Spitze des Schlauchs 38 gebildeter Tropfen die Innenwand eines Probenbehälters der

Mikrotiterplatte 36 seitlich berührt, so dass der Tropfen über die Innenwand abfließt, ohne abrupt abzureißen.

5 Ferner besteht zur Vermeidung eines störenden Tropfenabrisses auch die Möglichkeit einer Strukturierung hydrophiler und hydrophober Bereiche des Schlauchs 38, der Spitze des Schlauchs 38 und der Mikrotiterplatte 36.

10 Die Erfindung ist nicht auf das vorstehend beschriebene bevorzugte Ausführungsbeispiel beschränkt. Vielmehr ist eine Vielzahl von Varianten und Abwandlungen möglich, die ebenfalls von dem Erfindungsgedanken Gebrauch machen und deshalb in den Schutzbereich fallen.

**PATENTANSPRÜCHE**

- 5 1. Probenablageeinrichtung, insbesondere für einen Zellsortierer, mit
- einer Probenzuführung (38, 39) zur Zuführung von abzule-
  - genden Proben,
  - einer Probenablage (36) zur Ablage der Proben, wobei die
- 10 Probenablage (36) zur getrennten Ablage der Proben mehrere Probenbehälter aufweist,
- dadurch gekennzeichnet, dass**
- die Probenablage (36) zur Auswahl eines Probenbehälters beweglich angeordnet ist, während die Probenzuführung (38, 39)
- 15 ortsfest ist.
2. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenzuführung (38, 39) einen Schlauch (38) aufweist, dessen Mündungsöffnung ortsfest über der Pro-
- 20 benablage (36) fixiert ist.
3. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Schlauch (38) durch ein Führungsteil (39) geführt wird, um die Mündungsöffnung des Schlauchs (38) auf
- 25 die Probenablage (36) auszurichten.
4. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Führungsteil (39) eine Nut aufweist, in die der Schlauch (38) einführbar ist, um den Schlauchverlauf
- 30 festzulegen und die Mündungsöffnung des Schlauchs (38) auf die Probenablage (36) auszurichten.

5. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Führungsteil (39) aus einem autoklavierbaren und/oder sterilisierbaren Material besteht.

5 6. Probenablageeinrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Führungsteil (39) aus PEEK, LEXAN oder TEFLON besteht.

7. Probenablageeinrichtung nach einem der Anspruch 2 bis 6,  
10 **dadurch gekennzeichnet, dass** der Schlauch (38) und/oder das Führungsteil (39) lösbar über der Probenablage (36) fixiert ist.

8. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Schlauch (38) und/oder das Führungsteil  
15 (39) mit einem Haltemagneten (40) lösbar über der Probenablage (36) fixiert ist.

9. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Haltemagnet (40) an der Probenablageeinrichtung ortsfest montiert ist, während an dem Führungsteil  
20 (39) ein magnetisierbares Halteelement angebracht ist.

10. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** das magnetisierbare Halteelement in das Führungsteil (39) eingegossen oder von dem Führungsteil (39) umspritzt ist.  
25

11. Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** zur Positionierung der Probenablage (36) relativ zu der Probenzuführung (38, 39) ein Stellglied (42-44) vorgesehen ist.  
30

12. Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenablage (36) seitlich und in Richtung auf die Probenzuführung (38, 39) positionierbar ist.

5

13. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenablage (36) so weit in Richtung auf die Probenzuführung (38, 39) positionierbar ist, dass die Probenzuführung (38) in einen der Probenbehälter der Proben-  
10 ablage eintaucht.

14. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** die abzulegende Probe flüssig ist und eine materialabhängige Tropfenabrissgröße aufweist, wobei die Pro-  
15 benablage (36) so weit nach oben in Richtung auf die Probenzuführung (38) bewegbar ist, dass der Abstand zwischen der Probenzuführung (38) und der Probenablage (36) kleiner als die Tropfenabrissgröße ist.

20 15. Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenablage (36) in einem Inkubator (37) angeordnet ist.

25 16. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Inkubator (37) ein Sichtfenster und/oder eine Kamera und/oder eine zusätzliche Beleuchtung aufweist, um eine Sichtkontrolle zu ermöglichen.

30 17. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 15 oder 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Inkubator (37) eine Klimatisierungseinrichtung aufweist, die die Temperatur und/oder die Luftfeuchtigkeit und/oder den Kohlendioxidgehalt in dem Inkubator (37) einstellt.



18. Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenablage (36) eine Mikrotiterplatte ist oder Probenstreifen zur Aufnahme von PCR-Proben aufweist.

5

19. Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenablage (36) lösbar in der Probenablageeinrichtung angeordnet ist.

10 20. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenablage (36) manuell oder durch einen Roboter einführbar und/oder entnehmbar ist.

15 21. Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** zur Führung der Probenablage (36) seitlich angebrachte Metallkugeln oder federnde Kugeldruckstücke vorgesehen sind.

20 22. Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenablage (36) eine Abdeckung aufweist, die für die Ablage der Proben geöffnet werden kann und für die Entnahme und/oder den Transport der Probenablage (36) verschließbar ist.

25 23. Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Schlauch (38) mit dem Führungsteil (39) lösbar verbunden ist.

30 24. Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Schlauch (38) mit dem Führungsteil (39) dauerhaft verbunden ist.

25. Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenzuführung

(38, 39) über der Probenablage (36) angeordnet ist, wobei der Abstand zwischen der Probenzuführung (38, 39) und der Probenablage (36) kleiner als eine materialabhängige Tropfenabrissgröße ist, um bei der Ablage der Proben einen Tropfenabriss zu verhindern.

26. Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** zur Ablage von nicht interessierenden Proben ein Auffangbehälter (46) vorgesehen ist.

27. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Auffangbehälter (46) einen Deckel aufweist, der geöffnet werden kann.

28. Probenablageeinrichtung nach Anspruch 26 oder 27, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Auffangbehälter (46) entnehmbar ist.

29. Probenablageeinrichtung nach einem der Ansprüche 26 bis 28, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Auffangbehälter (46) aus einem autoklavierbaren Material besteht.

30. Probenablageeinrichtung nach einem der Ansprüche 26 bis 29, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Auffangbehälter (46) an seiner Oberseite mindestens eine muldenförmige Ausformung (47, 48) zum Abtupfen einer Probe aufweist.

31. Probenablageeinrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 30, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Schlauch (38) eine angeschrägte Spitze aufweist.

32. Probenablageeinrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 31, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Schlauch (38) zumindest im Bereich seiner Mündungsöffnung aus einem hydrophilen Mate-

rial besteht oder zumindest im Bereich seiner Mündungsöffnung mit einem hydrophilen Material beschichtet ist, um einen Tropfenabriss zu vermeiden.

5 33. Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenablage (36) mit einer Folie bedeckt ist, die von der Probenzuführung (38) penetrierbar ist.

10 34. Zellsortierer mit einer Probenablageeinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche.

35. Partikelmanipulator mit einer Probenablageeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 33, insbesondere Manipulator  
15 zur Fusion und/oder Poration von biologischen Objekten.

36. Fluidiksystem mit einer Probenablageeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 33, insbesondere System zum Mischen von Fluiden.

20

37. Probenablageverfahren, insbesondere zur Probenablage in einem Zellsortierer, mit den folgenden Schritten:

- Positionierung einer Probenzuführung (38) relativ zu einer Probenablage (36),
- 25 - Abgabe der abzulegenden Probe aus der Probenzuführung (38) in die Probenablage (36),

**dadurch gekennzeichnet, dass**

die Probenzuführung (38) ortsfest ist, während die Probenablage (36) bewegt wird.

30

38. Probenablageverfahren nach Anspruch 37, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probe flüssig ist und eine materialabhängige Tropfenabrissgröße aufweist, wobei die Probenablage (36) zur Abgabe der Probe so weit nach oben in Richtung der Pro-

benzuführung (38) bewegt wird, dass der Abstand zwischen der Probenzuführung (38) und der Probenablage (36) kleiner als die Tropfenabrissgröße ist.

- 5 39. Probenablageverfahren nach Anspruch 38, **dadurch gekennzeichnet, dass** bei der Abgabe der Probe ein Abstand zwischen der Probenzuführung (38) und der Probenablage (36) verbleibt.

\* \* \* \* \*

Probenablageeinrichtung für einen Zellsortierer

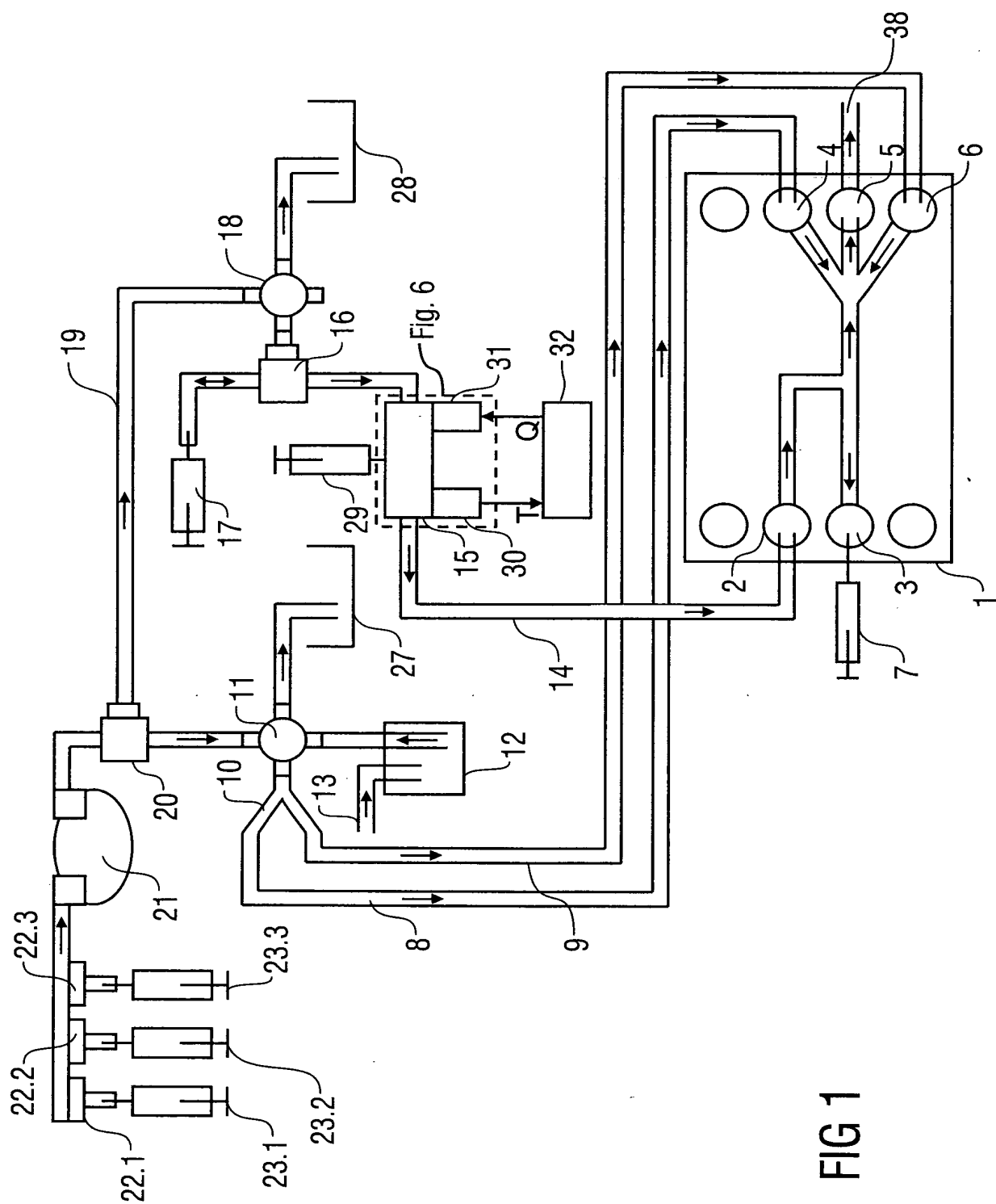
5

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft eine Probenablageeinrichtung, insbesondere für einen Zellsortierer, mit einer Probenzuführung (38, 39) zur Zuführung von abzulegenden Proben und einer Probenablage (36) zur Ablage der Proben, wobei die Probenablage (36) zur getrennten Ablage der Proben mehrere Probenbehälter aufweist. Es wird vorgeschlagen, dass die Probenablage (36) zur Auswahl eines Probenbehälters beweglich angeordnet ist, während die Probenzuführung (38, 39) ortsfest ist.

15

(Figur 3)



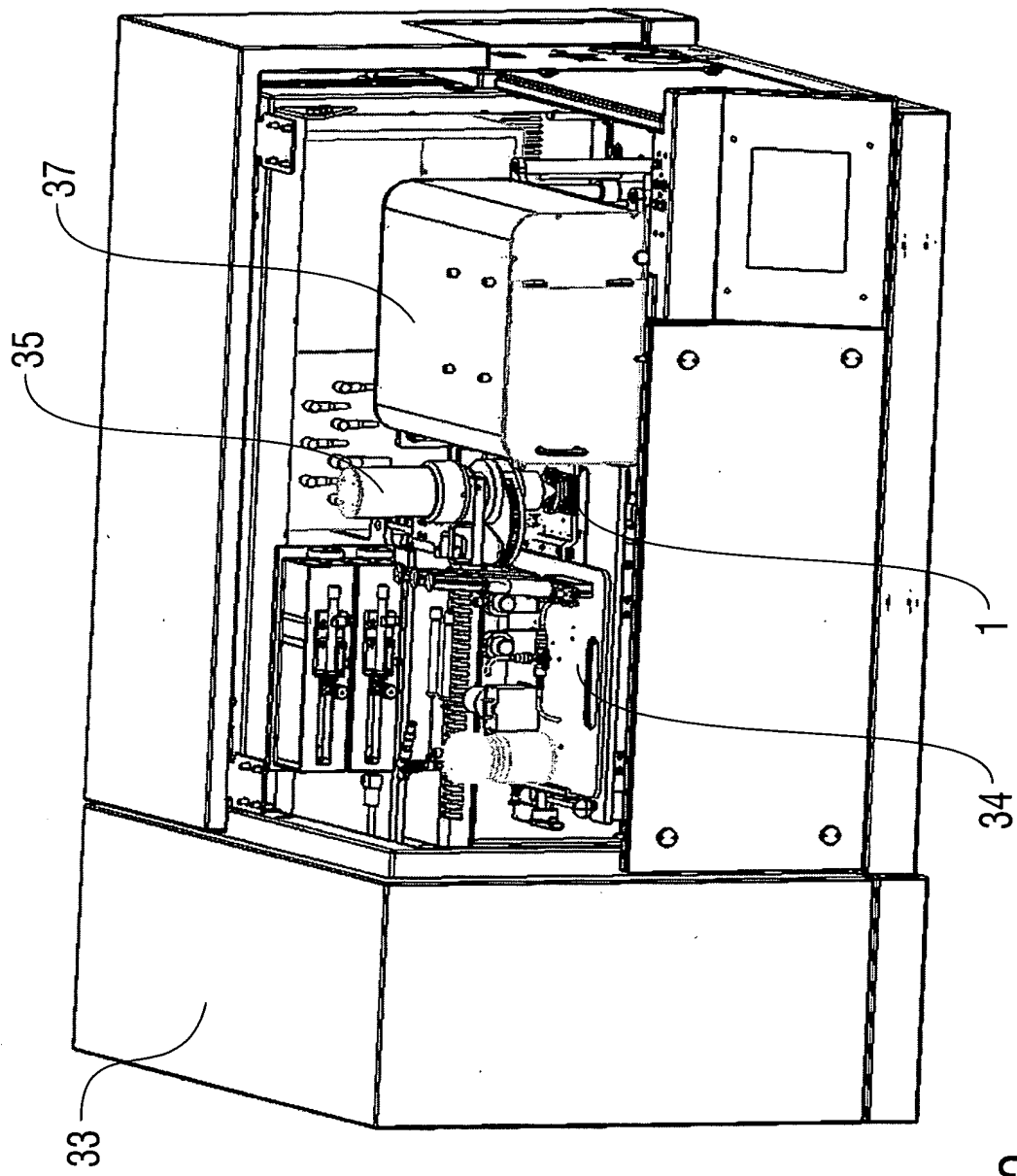


FIG 2

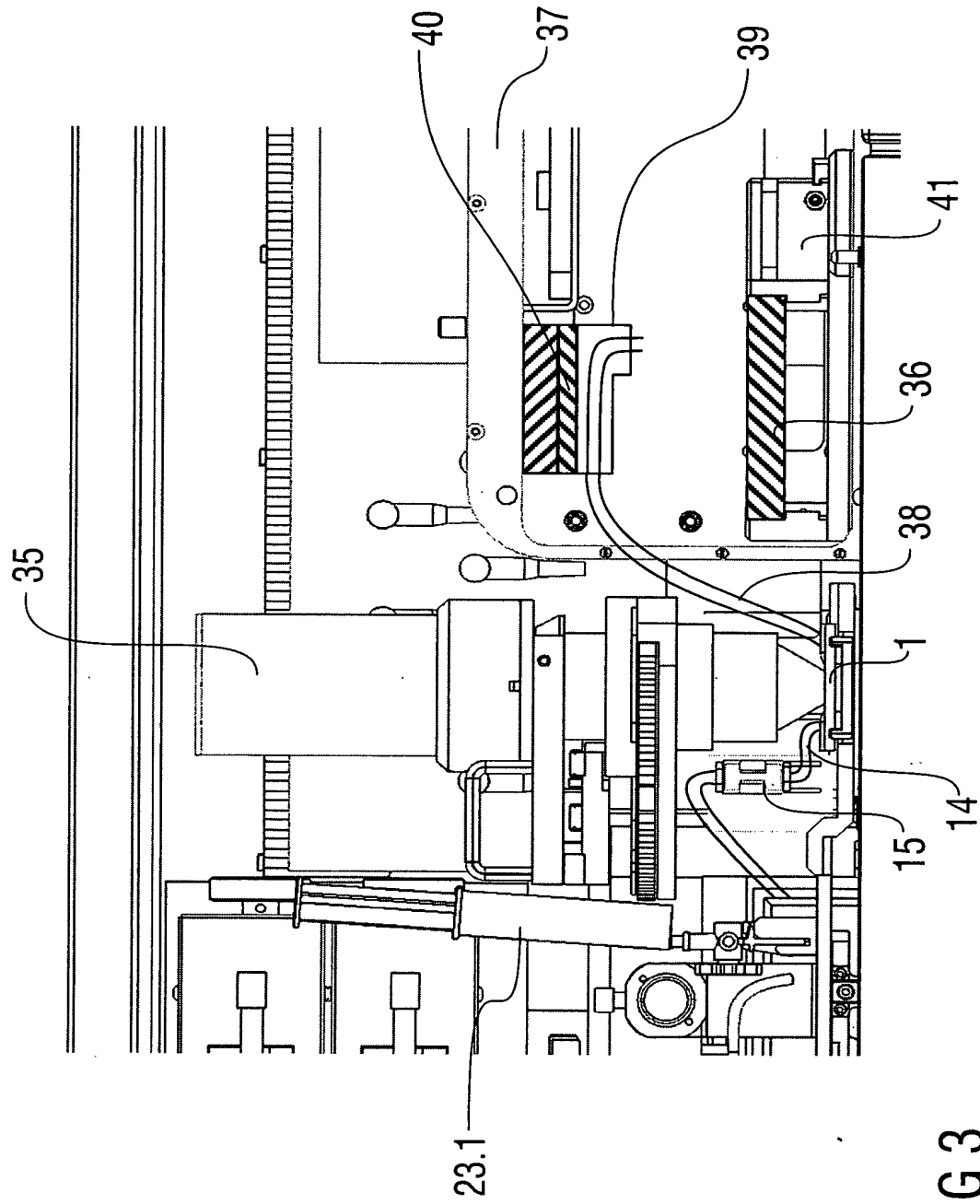


FIG 3



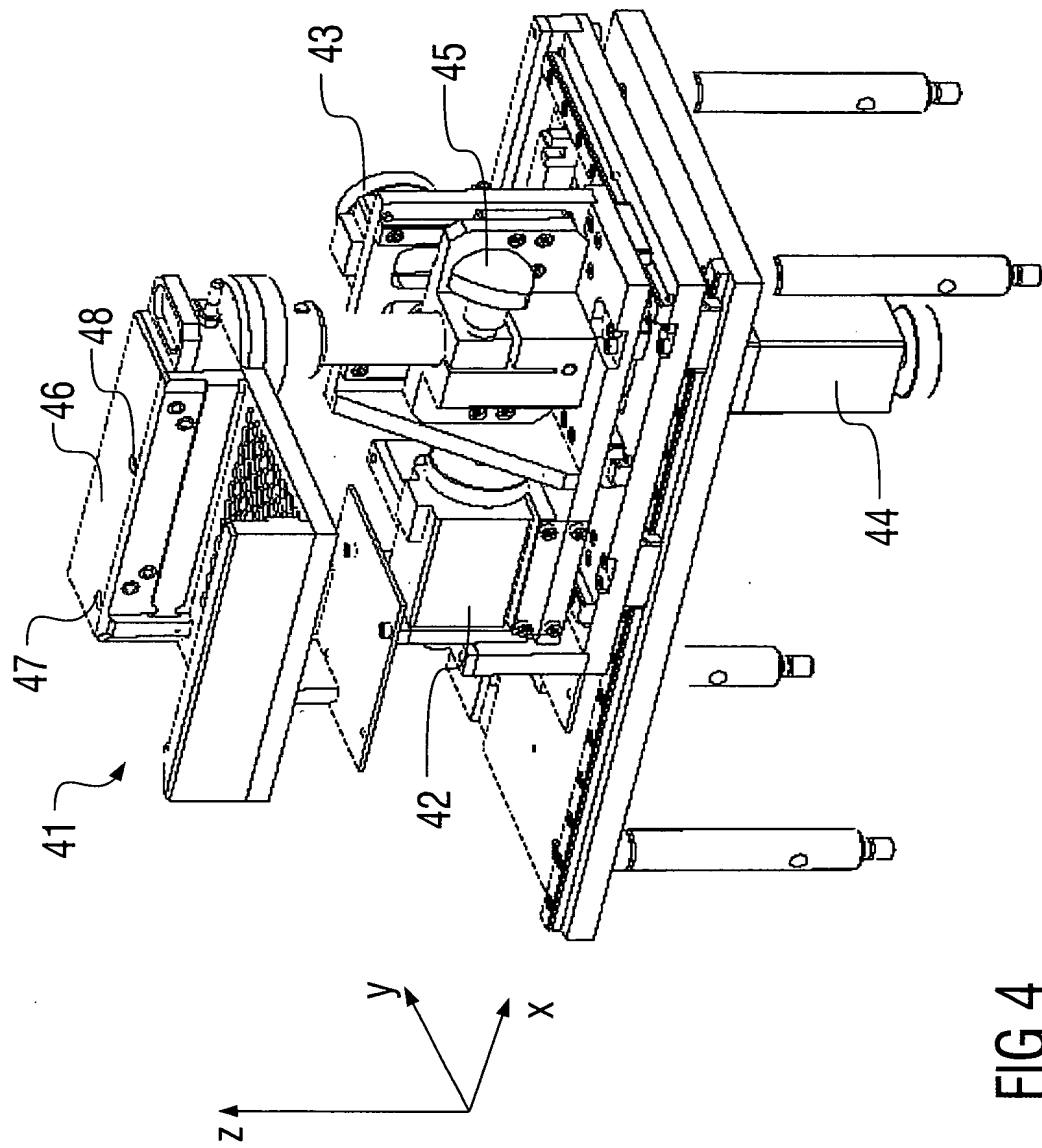


FIG 4